

# ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS ENOLÓGICAS DE *Lactobacillus plantarum*

Beatriz Rojo-Bezares, Yolanda Sáenz, Laura Navarro, Lorena Díez, Myriam Zarazaga,  
Fernanda Ruiz-Larrea, Carmen Torres

Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja.  
c/ Madre de Dios 51. 26006 Logroño. Teléfono: 941 299 749. e-mail: fernanda.ruiz@unirioja.es

## Resumen:

Se han caracterizado dos cepas de la especie *L. plantarum*, J23 y J51, provenientes de un mosto de uva tinta y de un vino tinto respectivamente. Ambas cepas presentan actividades inhibitorias del crecimiento de otras bacterias lácticas (BAL) de origen enológico, tanto de su misma especie como de las especies *L. hilgardii*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. pentosus* y de los géneros *Pediococcus* y *Oenococcus*. Estas actividades antimicrobianas son en ambos casos de naturaleza peptídica y por tanto, se denominan plantaricinas [1]. En los resultados que se presentarán se demuestra que la producción de la actividad J51 es dependiente de la cantidad de inóculo inicial de la cepa productora (mecanismo “quorum-sensing”), mientras que la producción de la actividad J23 es inducida por la presencia de otra cepa de BAL, utilizándose en todos los experimentos como cepa inductora: *L. hilgardii* J81. Se mostrarán las cinéticas de producción de ambas actividades y el efecto que producen el pH ácido del medio, la presencia de etanol y la presencia de glucosa, tanto sobre el crecimiento de las cepas como sobre la producción de las actividades plantaricina.

**Palabras clave:** *Lactobacillus plantarum*, plantaricinas, actividad antimicrobiana.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas (BAL) de la especie *Lactobacillus plantarum* se encuentran ampliamente diseminadas y pueden colonizar los más diversos nichos ecológicos, entre ellos se encuentran los vinos y los mostos de uva [4]. Cepas *L. plantarum* se utilizan en multitud de fermentaciones industriales por la producción de ácido láctico. También son importantes por su producción de sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica llamadas bacteriocinas, activas frente a microorganismos de la misma especie o especies con estrecha relación taxonómica con la cepa productora [1, 2]. Los parámetros físico-químicos del vino (etanol, pH, anhídrido sulfuroso, polifenoles, temperatura,...), la reserva de azúcares (glucosa, fructosa,...) así como otros componentes resultantes del metabolismo de las levaduras influyen en el desarrollo de las BAL responsables de la fermentación maloláctica (FML) del vino. Dependiendo de esas condiciones del vino, las BAL crecerán en mayor o menor medida y producirán un cierto tipo de metabolitos u otro. El objetivo de este trabajo es estudiar la producción de actividad plantaricina por dos cepas enológicas: *L. plantarum* J23 y J51, y los factores que influyen en esa producción.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Método de detección de actividad antimicrobiana: “spot-on-the-lawn” modificado [3]

Las cepas de la especie *L. plantarum* J23 y J51 se inocularon en forma de botón en placas de medio TSA (Difco) suplementado con 0,5% de extracto de levadura, y se incubaron durante 24 h a 30°C en estufa de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se inoculó la cepa indicadora (Tabla 1): se fundieron

5 ml de BHI semisólido en un tubo de ensayo. Cuando los tubos estuvieron atemperados, se inocularon 40 µl de una suspensión 1 McFarland en 0,9% de NaCl de la cepa indicadora y se dejó solidificar. Las placas se incubaron durante 24 h a 30°C en anaerobiosis, analizándose después la presencia o ausencia de halos nítidos de inhibición del crecimiento alrededor del botón de la bacteria productora.

### 2.2. Método de detección de actividad antimicrobiana en placas microtiter

El ensayo en placas microtiter de 96 pocillos se llevó a cabo del siguiente modo: cada pocillo de la placa microtiter contenía 50 l de MRS-líquido (2X), 50 µl de diluciones dobles seriadas de extracto activo libre de células y 10 µl de la cepa indicadora (5x10<sup>5</sup> UFC/ml de *Pediococcus pentosaceus* FBB63 para la cepa J23, y *L. hilgardii* J81 para la cepa J51). La cepa indicadora estaba resuspendida en agua destilada estéril. Las placas microtiter fueron incubadas durante 12-15 h, en estufa de CO<sub>2</sub> a 30°C, después de lo cual se midió la densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) en un lector de placas microtiter (Bio-Rad microtiter reader). La actividad antimicrobiana de los extractos activos libres de células, se calculó en unidades arbitrarias, definiendo una unidad arbitraria (UA) como el factor de dilución de la muestra que inhibe el 50% del crecimiento de la cepa indicadora (50% de la turbidez del control positivo de crecimiento de la cepa indicadora).

### 2.3. Efecto del etanol, pH y concentración de glucosa en la producción de actividad bacteriocina de *L. plantarum*

Para llevar a cabo el seguimiento del crecimiento y la producción de actividad bacteriocina a lo largo del tiempo



de la cepa *L. plantarum* J23, procedente de un mosto, y la cepa *L. plantarum* J51, procedente de un vino acabado, bajo distintas condiciones de concentración de etanol, pH y concentración de glucosa, se prepararon matraces de 100 ml de MRS-líquido con diferentes concentraciones de etanol (de 4 a 12% v/v), a diversos pHs (de 3 a 6) ajustados con 1 M de HCl, y dos medios de cultivo [TSBYE con diferentes concentraciones de glucosa (0, 2, 5, 10 y 20 g/L). y MRS-líquido].

La cepa *L. plantarum* J23 se inoculó en cocultivo con *L. hilgardii* J81 ( $10^8$  UFC/ml y  $10^7$  UFC/ml, respectivamente), ya que la cepa J23 necesita unas condiciones de inducción para producir actividad antimicrobiana [4]. Paralelamente se prepararon todos los controles correspondientes, para poder determinar el crecimiento de las cepas *L. plantarum* J23 y *L. hilgardii* J81 por separado. De forma similar se estudió la cepa *L. plantarum* J51, empleándose para ello el cultivo de la cepa J51 con un inóculo inicial de  $10^8$  UFC/ml, puesto que inóculos con un menor número de células no auto-inducen la producción de actividad antimicrobiana de J51 ya que es dependiente de mecanismos de "quorum-sensing" [5]. Todos los cultivos fueron incubados a 30°C en agitación y su evolución se siguió a lo largo de 72 h, midiendo la DO<sub>600</sub>. La actividad antimicrobiana de las muestras se analizó por el ensayo de placas microtiter.

### 3. RESULTADOS

La Tabla 1 muestra la actividad antimicrobiana de las cepas *L. plantarum* J23 y J51 ensayada por el método de "spot-on-the-lawn" usando otras BAL como indicadoras. El espectro de inhibición de las cepas *L. plantarum* J23 y J51 incluyó cepas de los géneros *Oenococcus* (61% y 91%, respectivamente), *Pediococcus* (70% y 100%, respectivamente) y *Lactobacillus* (16% y 68%, respectivamente) siendo *L. plantarum* J51 más activa que la cepa J23.

El estudio del efecto de diversos componentes del medio de cultivo se llevó a cabo mediante el ensayo de microtiter. Tanto la cepa *L. plantarum* J23 como la cepa inductora fueron muy sensibles a las concentraciones de etanol, cambios de pH y diferentes concentraciones de glucosa del medio, así como el tipo del medio de cultivo, observándose que una disminución en el crecimiento venía asociada a una menor producción de actividad antimicrobiana.

Por otro lado, la cepa *L. plantarum* J51 se comportó de forma similar con respecto al pH y la concentración de glucosa, de modo que tanto su crecimiento como su actividad bacteriocina se estaban directamente relacionados. Sin embargo, el comportamiento de J51 con respecto al etanol presente en el medio difirió del comportamiento de J23. En la Fig.1 se muestra el crecimiento y la producción bacteriocina

de J51 a diferentes concentraciones de etanol en el medio. Se observó que pequeñas concentraciones de etanol (6% y 8%) tienen un efecto activador de la producción de actividad antimicrobiana de J51 a pesar de que el crecimiento celular se encontraba disminuido. Estos resultados ponen de manifiesto la adaptación a la presencia de etanol de esta cepa procedente de un vino acabado. Cuando la concentración de etanol en el medio se aumentó al 12 %, ya tanto el crecimiento celular como la producción bacteriocina de *L. plantarum* J51 se vieron disminuidos.

### 4. CONCLUSIONES

- La producción de bacteriocinas y el grado de eficacia inhibiendo otras cepas BAL no depende de la especie, es una característica propia de cada cepa.
- Tanto el pH ácido como la presencia de etanol en el medio afecta negativamente al crecimiento de la cepa *L. plantarum* J23 y en consecuencia la producción de actividad bacteriocina disminuye significativamente.
- La presencia de bajas concentraciones de etanol (6-8%) en el medio de cultivo estimulan la producción de bacteriocina de la cepa *L. plantarum* J51.
- Un descenso en la concentración de glucosa en el medio de cultivo produce un descenso de la producción de bacteriocina en ambas cepas de *L. plantarum*.
- Los parámetros físico-químicos y los componentes del medio son sumamente importantes para controlar tanto el crecimiento de las cepas *L. plantarum* como la producción de sustancias antimicrobianas, y afectan de diferente manera a cepas de la misma especie.

### 5. BIBLIOGRAFÍA

1. JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. 1995. **Bacteriocins of gram-positive bacteria** *Microbiol. Rev.* 59 171200.
2. KLAENHAMMER, T. R. 1988. **Bacteriocins of lactic acid bacteria.** *Biochimie. Rev.* 70 337349.
3. LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T. J. 1991. **Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.** *J. Microbiol. Methods* 13 145-150.
4. ROJO-BEZARES, B.; SÁENZ, Y.; NAVARRO, L.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. 2007. **Co-culture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must.** *Food Microbiol.* 24 482-491.
5. NAVARRO, L., ZARAZAGA, M., SÁENZ J., RUIZ-LARREA, F., TORRES, C. 2000. **Bacteriocin production by lactic acid bacteria of Rioja red wines.** *Journal of Applied Microbiology*, 88: 44-51.

Tabla 1.- Actividad antimicrobiana de *L. plantarum* J23 y J51 frente a 70 BAL indicadoras por el método "spot-on-the-lawn".

| Bacteria indicadora<br>(Nº de cepas) | Inhibición del crecimiento producido<br>por <i>L. plantarum</i> J23 <sup>a</sup> |   |    | Inhibición del crecimiento producido<br>por <i>L. plantarum</i> J51 <sup>a</sup> |   |   |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---|----|----------------------------------------------------------------------------------|---|---|
|                                      | ++                                                                               | + | -  | ++                                                                               | + | - |
| <i>Oenococcus oeni</i> (23)          | 14                                                                               | 6 | 3  | 21                                                                               | 2 | - |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> (5)   | 5                                                                                | - | -  | 5                                                                                | - | - |
| <i>P. acidilactici</i> (3)           | 2                                                                                | 1 | -  | 3                                                                                | - | - |
| <i>P. parvulus</i> (2)               | -                                                                                | 2 | -  | -                                                                                | 2 | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> (22)  | 1                                                                                | 7 | 14 | 14                                                                               | 4 | 4 |
| <i>L. hilgardii</i> (3)              | 3                                                                                | - | -  | 3                                                                                | - | - |
| <i>L. paracasei</i> (2)              | -                                                                                | - | 2  | 2                                                                                | - | - |
| <i>L. brevis</i> (1)                 | -                                                                                | - | 1  | -                                                                                | - | 1 |
| <i>L. fermentum</i> (1)              | -                                                                                | - | 1  | 1                                                                                | - | - |
| <i>L. pentosus</i> (1)               | 1                                                                                | - | -  | 1                                                                                | - | - |
| <i>L. sakei</i> (1)                  | -                                                                                | - | 1  | -                                                                                | - | 1 |
| <i>Lactococcus lactis</i> (3)        | -                                                                                | - | 3  | -                                                                                | 1 | 2 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (3) | -                                                                                | - | 3  | -                                                                                | - | 3 |

<sup>a</sup> Clara inhibición del crecimiento (++) , débil inhibición del crecimiento (+), ausencia de inhibición del crecimiento (-).

Fig. 1. Efecto de diferentes concentraciones de etanol (0%, 6%, 8%, 10% y 12%) en el crecimiento y en la producción de la actividad bacteriocina de *L. plantarum* J51. Abreviaturas: ACT: actividad antimicrobiana, CB: crecimiento bacteriano.

